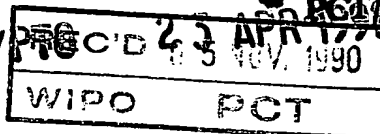


23 Rec'd PCT/



KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

# OCTROOIRAAD

B. v. d. I. E.

25 OKT 1990

Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 14 september 1989  
onder nummer 8902301, ten name van:

**Rijksuniversiteit te Leiden**

te Leiden

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Humaan parvovirus B19 eiwitten, hun produktie en hun gebruik  
in diagnostische assays en vaccins"

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

**PRIORITY DOCUMENT**

Rijswijk, 17 september 1990.

Namens de Voorzitter van de Octrooiraad,

(P.R.T.F. Tupan)



BESCHRIJVING

Humaan parvovirus B19 eiwitten, hun produktie en hun gebruik in diagnostische assays en vaccins

De uitvinding ligt zowel op het gebied van de genetische manipulatie door middel van de recombinant DNA technologie ten behoeve van de produktie van bepaalde eiwitten, als op de gebieden van de diagnostiek en de vaccinerbereiding. De uitvinding  
5 betreft bepaalde virale eiwitten, die bijv. gebruikt kunnen worden in assays voor het detecteren van tegen deze eiwitten gerichte antilichamen, of gebruikt kunnen worden om dergelijke antilichamen in handen te krijgen, of gebruikt kunnen worden om protectie tegen het virus te realiseren (derhalve gebruik voor  
10 vaccinatiedoeleinden). Meer in het bijzonder heeft de uitvinding betrekking op de manteleiwitten VP1 en VP2 van het humane parvovirus B19 en op virus-achtige partikels, die uit deze eiwitten bestaan. De uitvinding betreft tevens genetische informatie in de vorm van recombinante expressievectoren, die de  
15 voor deze eiwitten coderende genen bevatten, en organismen die dankzij genetische manipulatie onder toepassing van dergelijke vectoren het vermogen hebben verworven om de desbetreffende eiwitten te produceren.

Het humane parvovirus B19 werd in 1975 bij toeval ontdekt  
20 in serummonsters van enkele gezonde bloeddonoren. Sindsdien is gebleken dat het virus de veroorzaker is van erythema infectiosum - ook wel bekend als "vijfde ziekte" - en van de zogenaamde "aplastische crisis" bij patienten met chronische hemolytische anemie. Het B19-virus wordt voorts geassocieerd met  
25 abortus en vruchtdood, met arthrititis en met chronische anemie bij immuundeficiënte patienten. Infecties kunnen ook onder andere ziektebeelden voorkomen of geheel asymptomatisch verlopen.

8902301.1

Infecties met het over de gehele wereld voorkomende virus treden doorgaans op in epidemieën die ongeveer om de 3-6 jaar plaatsvinden, maar kunnen ook sporadisch optreden in tussenliggende jaren. Thans, veertien jaar na de ontdekking van het B19-virus, wordt de diagnostiek naar infectie met het virus nog steeds slechts in een beperkt aantal laboratoria ter wereld verricht. Omdat het virus op het moment dat de ziekteverschijnselen optreden niet meer bij de patiënten aantoonbaar is (viremie en virusuitscheiding gaan aan de symptomen vooraf), moet de diagnostiek zich richten op het aantonen van B19-specifieke (IgM)-antistoffen.

Hiertoe (en bijv. ook voor de bereiding van geschikte vaccins) is het noodzakelijk dat men kan beschikken over voldoende aanbod van B19-antigeen voor het opzetten van de testen. Een geschikt in-vitro-celkweekstelsel voor het vermenigvuldigen van het virus, waarmee voldoende antigeen kan worden verkregen, is echter niet beschikbaar.

De huidige parvo-B19-diagnostiek wordt uitgevoerd met virusantigeen dat min of meer toevallig ter beschikking komt (screening van bloeddonoren biedt een kans van naar schatting 1 op 50.000 op het aantreffen van viremisch bloed).

Om deze redenen bestaat er grote behoefte aan antigeen dat met behulp van recombinant DNA technieken wordt geproduceerd. Er zijn dan ook reeds verschillende voorstellen in deze richting gedaan, maar geen daarvan is echt bruikbaar gebleken voor het construeren van een diagnostische test.

De onderhavige uitvinding berust op het gebruik van een tamelijk recent ontwikkeld expressievector systeem, nl. het "Baculovirus Expressievector Systeem". In dit systeem wordt gebruik gemaakt van een helper-onafhankelijke recombinant virusvector van het baculovirus Autographica californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) om de B19 viruseiwitten tot expressie te brengen in insektencellen: Spodoptera frugiperda (Sf9). Dit systeem biedt vele voordelen ten opzichte van de gangbare expressievectorsystemen:

a) Met het oog op toepassing voor diagnostische en eventueel therapeutische (vaccinatie) doeleinden is geen kruisreac-

8902301.

tiviteit te verwachten tegen eiwitten van het baculovirus of de insektencellen (bij eiwitten die in E.coli tot expressie gebracht worden, is dit niet altijd uit te sluiten).

- 5 b) De viruseiwitten worden in grote hoeveelheden geproduceerd (1-500 mg/l) tot zelfs 50-75% van het totale eiwit, gedetecteerd op SDS-polyacrylamidegel (Summers en Smith, 1986, a manual of methods for baculovirus vector and insect cell culture procedures; Yong Kang, 1988; Adv. in Virus Res. 35, 177-192). Dit zijn aanmerkelijk grotere hoeveelheden dan
- 10 de produktie in prokaryote expressiesystemen of in chinese hamster ovarium cellen, zoals beschreven door Kajigaya et al (Blood 72(5), suppl.1, 44a, abstr. 86; 1988).
- 15 c) De eiwitten worden als non-fusieeiwitten geproduceerd, in tegenstelling tot bijvoorbeeld het B19-eiwit, dat als fusie-eiwit in E.coli geproduceerd is door Sisk en Berman (Biotechnology 5, 1077-1080, 1987). Dit recombinante  $\beta$ -galactosidase B19 fusieeiwit gaat alleen in oplossing bij
- 20 aanwezigheid van natriumdodecylsulfaat (SDS). De volgens de uitvinding in insektencellen tot expressie gebrachte eiwitten VP1 en VP2 kunnen daarentegen gemakkelijk in oplossing worden gebracht door sonificatie van de cellen in een buffer, die 25 mM NaHCO<sub>3</sub> en 20 mg/l NaN<sub>3</sub> (pH 9,5) bevat. Bij een dergelijke behandeling gaat 95% van de cellulaire eiwitten over in de oplosbare supernatant fractie.
- 25 d) De eiwitten worden geproduceerd in een gemakkelijk kweekbare insektencellijn, in tegenstelling tot de produktie van virus-eiwitten in humane erythroïde beenmergcellen (Ozawa et al, 1987; Blood 70, 384-391) of humane foetale erythroïde levercellen (Yaegashi et al, 1989; J. Virol. 63, 2422-2426).
- 30 e) Omdat in het baculovirus expressievector systeem pre- en posttranslatie modificaties optreden, zoals fosforylering, glycosylering, signaalpeptide-afplitsing en het verwijderen van introns door splicing, is het systeem zeer geschikt voor de produktie van biologisch actieve eiwitten met een
- 35 (vrijwel) natieve structuur (Yong Kang, 1988; Adv. in Virus Res. 35, 177-192). In dit systeem kunnen VP1 en VP2 van B19

8902301.

zowel afzonderlijk als gezamenlijk tot expressie gebracht worden.

- f) Een bijkomend voordeel van het baculovirus is, dat het zich niet vermenigvuldigt in zoogdiercellen en dus niet pathogeen is voor de mens, wat het werken met en het gebruiken van dit systeem veel veiliger maakt.

Volgens de uitvinding is het daadwerkelijk gelukt om de manteleiwitten VP1 en VP2 van het humane parvovirus B19 in een antigenisch werkzame vorm als non-fusieeiwitten in een hoge opbrengst te produceren met behulp van het baculovirus expressie systeem in insektencellen (Spodoptera frugiperda). Voorts is het gelukt om met de B19 viruseiwitten producerende insektencellen een selectieve en gevoelige immuno-fluorescentie-assay (IFA) te ontwikkelen voor de detectie van tegen de B19 viruseiwitten gerichte antilichamen. Op basis van de conform de uitvinding in insektencellen geproduceerde B19 viruseiwitten kunnen echter ook andere diagnostische assays worden ontwikkeld, zoals bijv. een Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA), een Radio-Immuno-Assay (RIA) of een agglutinatietest.

De uitvinding wordt in de eerste plaats belichaamd in recombinant VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit benodigde genetische informatie. De uitvinding strekt zich ook uit over recombinante virus-achtige partikels, die bestaan uit VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van deze B19 viruseiwitten benodigde genetische informatie.

Verder wordt de uitvinding belichaamd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 en/of VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is.

De uitvinding verschaft voorts een werkwijze voor het produceren van VP1 en/of VP2 eiwit van het humane parvovirus B19

89 02301.

(eventueel in de vorm van virus-achtige partikels, die uit beide eiwitten zijn opgebouwd) door Spodoptera frugiperda cellen te kweken, die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor  
5 expressie van het B19 viruseiwit benodigd is. Desgewenst en bij voorkeur worden het in de cellen gevormde B19 viruseiwit en/of de in de cellen gevormde virus-achtige partikels, die uit VP1 en VP2 eiwit bestaan, uit de cellen geïsoleerd. Een daartoe geschikte methode bestaat uit een sonificatie van de cellen in  
10 een buffer, die 25 mM NaHCO<sub>3</sub> en 20 mg/l NaN<sub>3</sub> (pH 9,5) bevat. Een dergelijke behandeling heeft tot gevolg, dat de in de cellen aanwezige eiwitten voor een groot gedeelte, bijv. voor 95%, in opgeloste vorm in de supernatant worden verkregen. Door op zichzelf bekende opzuiveringsmethodieken kunnen de B19 virus-  
15 eiwitten in een hogere zuiverheid worden geïsoleerd.

De uitvinding wordt ook belichaamd in recombinante baculovirus expressievectoren, voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 en/of VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 in Spodoptera frugiperda cellen benodigd  
20 is. Voorkeursuitvoeringsvormen van dergelijke recombinante baculovirus expressievectoren zijn de verder te beschrijven plasmiden pAcB19VP1-YM1, pAcB19VP2-YM1 en pAcB19VP1/2-YM1.

Tevens wordt de uitvinding belichaamd in recombinante baculovirussen, voorzien van de genetische informatie, welke  
25 voor expressie van VP1 en/of VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 in Spodoptera frugiperda cellen benodigd is. Voorkeursuitvoeringsvormen van dergelijke recombinante baculovirussen zijn de verder te beschrijven virussen AcB19VP1L, AcB19VP2L en AcB19VP1/2L.

30 De uitvinding strekt zich verder uit tot het gebruik van recombinant VP1 en/of VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit benodigde genetische  
35 informatie, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit gerichte antilichamen. De uitvinding omvat het gebruik van recombinante virus-achtige

8902301.1

partikels, die bestaan uit VP1 en/of VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van deze B19 viruseiwitten benodigde

5 genetische informatie, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 virus gerichte antilichamen. In voorkeursuitvoeringsvormen van de uitvinding gaat het hierbij om het gebruik van Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn  
10 voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 en/of VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit gerichte antilichamen, meer in het bijzonder in een immuno-fluorescentie-assay voor het in een te  
15 onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit gerichte antilichamen.

Ook strekt de uitvinding zich uit over een vaccinpreparaat voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19, omvattende recombinant  
20 VP1 en/of VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit benodigde genetische informatie, of een antigeen werkzaam deel van dit recombinante B19 viruseiwit, in  
25 combinatie met een of meerdere, voor vaccinatiedoeleinden geschikte dragers en/of hulpstoffen, alsmede over een vaccinpreparaat voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19, omvattende recombinante virus-achtige partikels, die bestaan uit VP1 en VP2  
30 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van deze B19 viruseiwitten benodigde genetische informatie, in combinatie met een of meerdere, voor vaccinatiedoeleinden  
35 geschikte dragers en/of hulpstoffen.

De uitvinding omvat tevens het gebruik van recombinant VP1 en/of VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 (of daaruit

8902301.

bestaande virus-achtige partikels), gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit benodigde genetische informatie, of van een antigeen werkzaam deel van dit recombinante B19 viruseiwit, voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19.

In het hiernavolgende experimentele gedeelte wordt bij wijze van toelichting getoond hoe de uitvinding in praktijk is gebracht en in praktijk kan worden gebracht. Zoals uit de voorbeelden blijkt, werden de DNA sequenties, coderend voor de structurele eiwitten VP1 en VP2 van het humane parvovirus B19, geïsoleerd uit het B19-virus uit het serum van een patient. Vervolgens werd via subcloneringsstappen in pUC19 en pUC7 het B19-DNA gecloneerd in de baculovirusvector pAcYM1 achter de promotor voor het polyhedrine-gen van het baculovirus. Door middel van cotransfectie van deze recombinantvector met wildtype baculovirus DNA en daarop volgende recombinatie in de insektencellen (Spodoptera frugiperda) werd tenslotte recombinant virus geïsoleerd, dat na infectie in de insektencellen leidde tot de produktie van de manteleiwitten VP1 en VP2 van B19. Met behulp van deze B19-eiwitten producerende insektencellen is een diagnostische test ontwikkeld, "de Immuno-Fluorescentie-Assay (IFA) voor B19", die op snelle, eenvoudige en gevoelige wijze de mogelijkheid biedt tot detectie van B19-specifieke antilichamen (IgG zowel als IgM) in sera. De op deze wijze geproduceerde eiwitten kunnen eveneens dienen als eenvoudig te verkrijgen antigeen voor andere diagnostische testen als ELISA, RIA en agglutinatietests en als B19-eiwit voor de mogelijke produktie van vaccins en subunit-vaccins.

#### Figuurbeschrijving

Figuur 1 toont de genetische structuur van het humane parvovirus B19, dat een enkelstrengs DNA virus met een DNA van ongeveer 5500 nucleotiden is. Volgens Ozawa et al 1987; J. Virol. 61, 2395-2406 bevatten de nucleotiden 2444-4787 de voor VP1 (84 kd) coderende sequentie en bevatten de nucleotiden 3125-

902301.



4787 de voor VP2 (58 kd) coderende sequentie. Niet weergegeven zijn de 4 splicing donor-sites, gelegen tussen de nucleotiden 2177 en 2195, en de 2 acceptor-sites, gelegen tussen de nucleotiden 3043 en 3050. Voor de produktie van VP2 tijdens de virus-replicatie wordt de tussenliggende sequentie (nucleotiden 2177-3050, waarin zich onder andere het startcodon voor VP1 bevindt) door splicing verwijderd.

Figuur 1 toont verder het cloneringschema voor de constructie van recombinant baculovirus met humaan parvovirus B19 genen.

#### Voorbeeld 1: Expressie van parvovirus B19 VP1.

##### 1. Isolatie van parvovirus B19 DNA uit patientenserum.

Nadat in het serum van een patient B19 DNA was aangetoond door middel van de "polymerase chain reaction" en Dot-Spot-Hybridisatie met B19-specifieke DNA probes (Salimans et al, 1989; J. Virol. Meth. 23, 19-28) werd het B19 DNA hieruit geïsoleerd door incubatie met proteinase K en SDS (1 ml serum werd 2 uur bij 37°C geïncubeerd met 100 µg proteinase K in een buffer, die 10 mM Tris-Cl (pH 7,5), 5 mM EDTA en 0,5% SDS bevatte), phenol-extractie om het eiwit te verwijderen en DNA precipitatie door middel van ethanol. Het DNA werd gecontroleerd op grootte, restrictieenzym patronen en southern blot analyse (Maniatis et al, 1982; Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.) met B19-specifieke DNA probes.

##### 2. Subcloneren in pUC19 (figuur 1).

De technieken voor de manipulaties met B19-DNA en plasmide-DNA werden in essentie uitgevoerd zoals beschreven is door Maniatis et al (1982; Molecular cloning: a laboratory manual). Het B19 DNA werd geknipt met HindIII (bp 2430) en ScaI (bp 4920) en in pUC19 (geknipt met HindIII en SmaI) geligeerd teneinde een grotere hoeveelheid van de coderende sequentie te verkrijgen. (Door ScaI in SmaI te ligeren werd deze knipplaats verwijderd). Het verkregen plasmide (pUC19-B19VP1) werd gecontroleerd door

8902301.1

restrictieenzym analyse en hybridisatie en getransformeerd naar en vermenigvuldigd in E.coli JM101.

### 3. Subcloneren in pUC7 (figuur 1).

5 Om aan de uiteinden van het B19 DNA BamHI-sites te creëren, werd het DNA gecloneerd naar pUC7, dat een symmetrische poly-linker bevat met twee BamHI-sites. Het B19 DNA werd uit pUC19 geknipt met HindIII en EcoRI en tevens met ScaI om het restant van het vector-DNA te verwijderen. Het B19 DNA fragment met de  
10 juiste lengte werd uit agarosegel geïsoleerd, ingevuld met "Klenow large fragment polymerase" en geligeerd met HincII geknipt pUC7 plasmide (eveneens blunt uiteinden). Het geligeerde DNA (PUC7-B19VP1) werd getransformeerd naar en vermenigvuldigd in E.coli JM101. Afzonderlijke colonies werden getest op de  
15 aanwezigheid van B19 DNA door middel van restrictieenzym analyse en hybridisatie met een B19 specifieke DNA probe (het 700bp PstI-fragment van B19, Salimans et al, 1989; J. Virol.Meth. 23, 19-28).

20 4. Cloneren in de baculovirus-vector pAcYM1 (figuur 1). De technieken voor manipulaties met het baculovirus, de baculovirusvector en de insectencellen werden in essentie uitgevoerd als beschreven door Summers en Smith in 1986 (a  
manual of methods for baculovirusvector and insect cell culture  
25 procedures). De restrictie-site achter de polyhedrinepromoter van het baculovirus is een BamHI-site. Aangezien het B19 DNA ook een interne BamHI-site bevat werd voor de volgende strategie gekozen: het B19 DNA werd uit pUC7 geknipt met EcoRI en het resterende deel van pUC7 werd geknipt met ScaI (deze ScaI  
30 digestie is niet noodzakelijk voor cloneren van VP2 DNA). Het B19 DNA werd uit de gel geïsoleerd, gedefosforyleerd met Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) en tenslotte werd een partiële digestie uitgevoerd met BamHI. Het BamHI-fragment met de juiste lengte (2,5 kb voor VP1 en 1,8 kb voor VP2) werd  
35 vervolgens geligeerd met, met BamHI geknipte en CIP behandelde baculovirusvector, pAcYM1 (Matsuura et al, 1987; J. Gen. Virol. 68, 1233-1250). Het aldus verkregen plasmide (pAcB19VP1-YM1)

8902301.

werd in E.coli HB101 vermenigvuldigd. Recombinante plasmiden werden gecontroleerd op de aanwezigheid van B19 DNA (met specifieke B19 DNA probes) en de juiste orientatie hiervan ten opzichte van de polyhedrine promotor (door middel van restrictieenzym analyse). Constructen met de juiste orientatie werden opgekweekt en geïsoleerd uit de bacteriecellen volgens "the rapid boiling" methode van Holmes en Quigley (1981; Anal. Bioch. 114, 193-197) met een laatste zuivering op een CsCl-gradient.

5. Cotransfectie met wildtype baculovirus DNA:AcNPV (figuur 1). Door middel van een cotransfectie van het pAcB19VP1-YM1 construct met wildtype baculovirus DNA (AcNPV) werd het DNA in de insektencellen (Spodoptera frugiperda-Sf9) gebracht (volgens methode II van Summers en Smith, 1986; a manual of methods for baculovirusvector and insect cell culture procedures). In 0,5-3,0% van de infecties recombineert de recombinant vector (pAcB19VP1-YM1) met het wildtype virus DNA tijdens de opname in de cellen, aldus een recombinant virus genererend, dat het B19 DNA bevat: AcB19VP1L. Het polyhedrine-gen is vervangen door het VP1 DNA (in voorbeeld 2, waarin de vorming van een recombinant virus AcB19VP2L wordt beschreven, door het VP2 DNA).

6. Zuiveren van recombinant-virus (AcB19VP1L, resp. AcB19VP2L). De titer van het virus (wildtype zowel als recombinant) geproduceerd door de Sf9-cellen werd bepaald door middel van een plaque-assay. Twintig plaque-forming units (pfu) werden op een monolaag van Sf9-cellen in een 96-well plaat gebracht (20 pfu/well) en geïncubeerd bij 27°C. Drie dagen na de infectie werden de supernatanten verwijderd en bewaard en de cellen gelyseerd en gespot op nitrocellulose (Pen et al, 1989; Nucl. Acid Res. 17, 451). Met een parvovirus B19 specifieke DNA probe werd gescreend op de aanwezigheid van recombinant virus. De titer van de verzamelde supernatanten van recombinant virus bevattende wells werd door middel van een plaque-assay bepaald en vervolgens uitverdund tot 1 pfu/well op een 96-well plaat. Na een screening als hierboven beschreven met de dot-spot-

8902301.

hybridisatie-assay werd van de positieve supernatanten in een plaque-assay de titer bepaald en bovendien met een microscoop gescreend op de afwezigheid van het polyhedrine eiwit in de plaques, aangevend dat de plaque recombinant virus bevat. Deze  
5 plaques werden geënt op een Sf9-monolaag in een 96 well plaat. Na drie dagen werd weer een dot-spot-hybridisatie uitgevoerd en positieve wells werden in een plaque-assay gecontroleerd. De recombinanten werden als zuiver beschouwd wanneer minder dan 1 op de 500 plaques wildtype virus bevatte.

10

#### 7. Controle van het recombinant virus (AcB19VP1L).

Uit cellen, geïnfecteerd met recombinant virus, werd totaal DNA geïsoleerd, geknipt met restrictieenzymen en na southern blotting gecontroleerd door hybridisatie met parvovirus B19  
15 specifieke DNA probes.

Zuiver recombinant virus werd gebruikt om insektencellen (Sf9) te infecteren met een m.o.i. (multiplicity of infection) van 1-5 en parvovirus VP1 en VP2 in deze cellen tot expressie te brengen. Vervolgens werden de manteleiwitten VP1 en VP2 van het  
20 humane parvovirus B19, geproduceerd in het baculovirus expressievector systeem, geanalyseerd en gecontroleerd met de hieronder beschreven technieken:

#### 8. Biosynthese van recombinant VP1.

25 Twee dagen na infectie met recombinant virus (AcB19VP1L, m.o.i. 5) werden insektencellen ( $10^6$  Sf9-cellen in 35mm-petrischaal) gedurende 4 uren gekweekt bij 27°C in methioninevrij "Grace"-medium waaraan 100 uCi  $^{35}\text{S}$ -methionine was toegevoegd, om de "de novo" synthese van eiwitten te bepalen. Nadat de supernatant was  
30 verwijderd, werden de cellen opgenomen in PBS (phosphate buffered saline). Zowel supernatant als celfractie werden opgenomen in lyserende buffer, gedurende 5 minuten gekookt en op een 10% SDS-polyacrylamidegel geanalyseerd. Dezelfde experimenten werden uitgevoerd met ongeïnfecteerde en wildtype  
35 baculovirus geïnfecteerde cellen. Na autoradiografie (niet getoond) bleek dat de polyhedrineband (30kd), die bij de wildtype infectie sterk overheerste, verdween bij de recombinant

8902301.

virussen en dat een eiwit ter grootte van het VP1 van B19 (84kd) werd gesynthetiseerd.

9. Analyse op SDS-PAGE.

5 Spodoptera frugiperda cellen werden na infectie met recombinant virus (m.o.i.5) gedurende vijf dagen geanalyseerd op de produktie van VP1 van B19-virus op 10% SDS-polyacrylamidegel. De gels werden gekleurd met "fast green". Uit de (niet getoonde) gelresultaten bleek, dat VP1 in grote hoeveelheden vanaf dag 2  
10 werd geproduceerd als een stabiel produkt, dat ook na 5 dagen nog duidelijk aanwezig was. VP1 werd in vergelijkbare hoeveelheden geproduceerd als het polyhedrine-eiwit in wildtype baculovirus geïnfecteerde cellen.

15 10. Antigeniciteit van de geproduceerde eiwitten.

100 ng eiwit van cellysaten van Sf9-cellen 2 dagen na infectie (m.o.i.5) werd geëlectroforeerd op 10% SDS-polyacrylamidegel en geblot naar nitrocellulose (3 uur; 70V in 25mM Tris, 192 mM glycine en 20% methanol). Vervolgens werden 20 humane sera  
20 getest op reactiviteit met het recombinant VP1 antigeen (15 IgG-positieve sera en 5 IgG negatieve sera). De reacties werden bij kamertemperatuur uitgevoerd: overnacht blokkade door incubatie van het nitrocellulosefilter in PBS/ 5% Foetal Calf Serum (FCS)/ 0.05% Tween 20; incubatie met sera (1:500 verdunning voor de  
25 positieve sera en 1:50 verdunning voor de negatieve sera) verdund in PBS/ 5% FCS gedurende 1,5 uur; daarna wassen van de filters gedurende 1 uur met PBS/ 0,05% Tween 20 en vervolgens incuberen met 1:500 verdund alkalisch fosfatase gelabeld geit-anti-mens-totaal Ig (Tago, cat.no.:2493) in PBS/ 0.05% Tween 20/  
30 5%FCS; na 2x wassen in PBS/ 0,05% Tween 20 en 2x in PBS werden gebonden antilichamen gedetecteerd met 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfaat (BCIP). De 15 positieve IgG sera reageerden alle met de recombinant-VP1 band op de gel en de 5 negatieve IgG sera gaven geen reactie.

35

8902301.

11. Testen van sera in een immuno-fluorescentie-assay.

Sf9-cellen, geïnfecteerd met recombinant virus (AcB19VP1L, m.o.i.1), werden na 3-4 dagen opgenomen in TC100 medium (Gibco-BRL), met ongeïnfecteerde cellen gemengd tot een percentage van  
5 ongeveer 25% B19 recombinant VP1 bevattende cellen en gespot op 18 well-glaasjes (nutacon, cat.no.10-404) met een concentratie van ongeveer 5000 cellen/well (5 ul) en na drogen aan de lucht gefixeerd in 100% aceton gedurende 20 minuten bij -20°C.

Vervolgens werden de cellen geïncubeerd met humane sera

10 (positieve en negatieve sera voor B19-Ig) bij verschillende verdunningen in VBS (veronal buffered saline). Deze sera werden voorbehandeld met leverpoeder voor een reductie van mogelijke achtergrondkleuring. Na incubatie gedurende 1-2 uren bij 37°C werden de glaasjes gewassen in PBS en aan de lucht gedroogd  
15 voordat geïncubeerd werd met een 1:40 verdunning van FITC-gelabeld geit-anti-mens-IgG (Kallestad, cat.no.:104) in VBS met 1:500 "Evans Blue" (Hoffmann La Roche). Na wassen in PBS en drogen aan de lucht werd Tris/glycerol buffer (1g Tris in PBS, 80% glycerol, pH 9,9) toegevoegd en geanalyseerd onder de UV-  
20 microscoop. In B19-IFA's met positieve patiënten-sera waren naast de fluorescerende cellen ook niet-geïnfecteerde cellen waarneembaar (de resultaten worden niet getoond). De bruikbaarheid van de B19-IFA werd in een aantal onderbeschreven experimenten getest:

25 a) "Dubbel-blind" experiment.

30 patiënten sera werden volgens de procedure in 1:50 en 1:500 verdunningen getest, waarbij voor de "onderzoeker" onbekend was welke van de sera positief of negatief waren. Na aflezing door  
30 meerdere medewerkers werden de uitslagen vergeleken met de data uit de RIA-test (Cohen et al, 1983; J. Hyg. 91, 113-130): alle 17 IgG-positieve sera werden in de B19-IFA als positief afgelezen en alle 13 IgG-negatieve sera als negatief.

35 b) Titratie.

Van een aantal bekend positieve patiënten (volgens de test-resultaten van de RIA, uitgevoerd met totaal virus uit serum

8902301.

geïsoleerd, Cohen et al, 1983; J. Hyg. 91, 113-130) werd een IFA-titer bepaald. De resultaten zijn weergegeven in tabel 1. Uit de data blijkt, dat deze B19-IFA overeenkomstige resultaten geeft met de RIA gegevens: sera met hoog positieve waarden in de RIA hebben ook in de B19-IFA hoge titers en sera met laag positieve waarden in de RIA geven lagere titers in de B19-IFA.

c) Screening van donoren.

100 willekeurig geselecteerde bloeddonoren werden gescreend op de aanwezigheid van B19-specifieke IgG antilichamen en uit de resultaten bleek, dat in deze B19-IFA 76% van de donoren positief waren, wat zeer wel overeenstemt met de gegevens zoals die voor het humane parvovirus B19 beschreven zijn voor deze leeftijdsgroep.

Voorbeeld 2: Expressie van parvovirus B19 VP2.

Subcloneren van VP2 in pUC7.

Voor de clonering van het VP2 van parvovirus B19 werd uitgegaan van het B19 DNA dat in pUC19 is gecloneerd volgens de procedure zoals beschreven in voorbeeld 1 onder punten 1 en 2. Een 1,8 kb fragment, coderend voor VP2, werd met HpaII (bp3083) en EcoRI uit het pUC19 construct (pUC19-B19VP1) geknipt, uit agarosegel geïsoleerd, ingevuld met "Klenow large fragment DNA polymerase" en geligeerd met, met HincII geknipt pUC7 plasmide. Het nieuwe pUC7 construct (pUC7-B19VP2) werd vervolgens vermenigvuldigd in E.coli JM101. Bacteriecolonies werden vervolgens getest op de aanwezigheid van een B19-insertie door middel van restrictie-enzymanalyse en hybridisatie met een B19 specifieke DNA probe (Salimans et al, 1989; J. Virol. Meth. 23, 19-28). Verder werd dezelfde procedure gevolgd zoals beschreven is voor VP1 in voorbeeld 1 onder punten 4-7 om recombinant baculovirus met het DNA coderend voor VP2 van het humane parvovirus te genereren en VP2 te produceren in de insektencellen (AcB19VP2L).

8902301.

Voorbeeld 3: Expressie van parvovirus B19 VP1 en VP2 met behulp van een recombinant baculovirus

Voor de produktie van VP1 en VP2 wordt "in vivo" dezelfde  
5 parvovirus promoter gebruikt. Dankzij een splicingsmechanisme  
kunnen beide eiwitten worden geproduceerd. De optredende  
splicing leidt tot een verwijdering van het VP1 startcodon,  
zodat het aparte startcodon van VP2 gebruikt kan worden voor de  
produktie van VP2. Omdat een dergelijk splicingsproces ook in  
10 het baculovirus expressiesysteem kan plaatsvinden (dit is voor  
poliovirus aangetoond door Urakawa et al, J. Gen. Virol. 70,  
1453-1463, 1989) werd voor de gelijktijdige produktie van VP1 en  
VP2 met een recombinant baculovirus (eventueel leidend tot de  
vorming van parvovirus-achtige partikels, zoals ook beschreven  
15 is voor poliovirus) een 2,85 kb fragment van B19 DNA gecloneerd,  
dat de genoemde splicing donor- en acceptor-sites bevat.  
Daartoe werd B19 DNA, geïsoleerd volgens de in voorbeeld 1 onder  
punt 1 beschreven procedure, geknipt met AvaI (bp 2071) en ScaI  
(bp 4920), ingevuld met "Klenow large fragment polymerase" en  
20 geligeerd met het met HincII geknipte pUC7 plasmide. Het nieuwe  
pUC7 construct (pUC7-B19VP1/2) werd vervolgens in E. coli JM101  
vermenigvuldigd. Daarna werd dezelfde procedure gevolgd als  
beschreven in voorbeeld 2 om recombinant baculovirus met het  
DNA, coderend voor VP1 inclusief de daaraan voorafgaande  
25 splicing sites van het humane parvovirus B19, te genereren en  
zowel VP1 als VP2 in de insektencellen (AcB19VP1/2L) te  
produceren.

8902301.



Tabel 1: Vergelijking tussen B19-IFA titers van IgG positieve sera en RIA a.u. (arbitrary units).

	<u>Patientensera</u>	<u>RIA(a.u.)</u>	<u>B19-IFA titer</u>
5	1	>100	>16384
	2	100	>16384
	3	91	16384
	4	70	>16384
	5	58	>16384
10	6	55	>16384
	7	42	16384
	8	40	16384
	9	25	8192
	10	15,5	4096
15	11	11	4096
	12	8,4	4096
	13	7,6	1024
	14	4,2	512
	15	4,0	512
20	16	2,5	---
	17	1,8	256
	18	1,2	---
	19	---	---
	20	---	---
25	21	---	---

89 02 301.

Nw 2243

CONCLUSIES

1. Recombinant VP1 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit benodigde genetische informatie.
2. Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is.
3. Werkwijze voor het produceren van VP1 eiwit van het humane parvovirus B19 door Spodoptera frugiperda cellen te kweken, die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van het B19 viruseiwit benodigd is.
4. Werkwijze volgens conclusie 3, waarbij het in de cellen gevormde B19 viruseiwit uit de cellen wordt geïsoleerd.
5. Recombinante baculovirus expressievector, voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 eiwit van het humane parvovirus B19 in Spodoptera frugiperda cellen benodigd is.
6. Recombinante baculovirus expressievector pAcB19VP1-YM1.
7. Recombinant baculovirus, voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 eiwit van het humane parvovirus B19 in Spodoptera frugiperda cellen benodigd is.
8. Recombinant baculovirus AcB19VP1L.
9. Gebruik van recombinant VP1 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit benodigde genetische informatie, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit gerichte antilichamen.

8902301.

10. Gebruik van Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is, in een assay voor het in  
5 een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit gerichte antilichamen.
11. Gebruik van Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 eiwit van  
10 het humane parvovirus B19 benodigd is, in een immuno-fluorescentie-assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit gerichte antilichamen.
12. Vaccinpreparaat voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19,  
15 omvattende recombinant VP1 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit benodigde genetische informatie, of een antigeen werkzaam deel van dit recombinante  
20 B19 viruseiwit, in combinatie met een of meerdere, voor vaccinatiedoeleinden geschikte dragers en/of hulpstoffen.
13. Gebruik van recombinant VP1 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de  
25 voor expressie van het B19 viruseiwit benodigde genetische informatie, of van een antigeen werkzaam deel van dit recombinante B19 viruseiwit, voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19.
- 30 14. Recombinant VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit benodigde genetische informatie.
- 35 15. Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de

8902301.

genetische informatie, welke voor expressie van VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is.

16. Werkwijze voor het produceren van VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 door Spodoptera frugiperda cellen te kweken, die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van het B19 viruseiwit benodigd is.
17. Werkwijze volgens conclusie 16, waarbij het in de cellen gevormde B19 viruseiwit uit de cellen wordt geïsoleerd.
18. Recombinante baculovirus expressievector, voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 in Spodoptera frugiperda cellen benodigd is.
19. Recombinante baculovirus expressievector pAcB19VP2-YM1.
20. Recombinant baculovirus, voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 in Spodoptera frugiperda cellen benodigd is.
21. Recombinant baculovirus AcB19VP2L.
22. Gebruik van recombinant VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit benodigde genetische informatie, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit gerichte antilichamen.
23. Gebruik van Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit gerichte antilichamen.
24. Gebruik van Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is, in een immuno-fluorescentie-assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 viruseiwit gerichte antilichamen.

8902301..

25. Vaccinpreparaat voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19, omvattende recombinant VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit benodigde genetische informatie, of een antigeen werkzaam deel van dit recombinante B19 viruseiwit, in combinatie met een of meerdere, voor vaccinatiedoeleinden geschikte dragers en/of hulpstoffen.
- 10 26. Gebruik van recombinant VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van het B19 viruseiwit benodigde genetische informatie, of van een antigeen werkzaam deel van dit recombinante B19 viruseiwit, voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19.
- 15 27. Recombinante virus-achtige partikels, die bestaan uit VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van deze B19 viruseiwitten benodigde genetische informatie.
- 20 28. Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is.
- 25 29. Werkwijze voor het produceren van VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, en/of van virus-achtige partikels, die bestaan uit VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, door Spodoptera frugiperda cellen te kweken, die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van deze B19 viruseiwitten benodigd is.
- 30 30. Werkwijze volgens conclusie 29, waarbij de in de cellen gevormde B19 viruseiwitten en/of virus-achtige partikels, die uit deze eiwitten bestaan, uit de cellen worden geïsoleerd.
- 35

8902301.

31. Recombinante baculovirus expressievector, voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 in Spodoptera frugiperda cellen benodigd is.
- 5 32. Recombinante baculovirus expressievector pAcB19VP1/2-YM1.
33. Recombinant baculovirus, voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 in Spodoptera frugiperda cellen benodigd is.
- 10 34. Recombinant baculovirus AcB19VP1/2L.
35. Gebruik van recombinante virus-achtige partikels, die bestaan uit VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor
- 15 expressie van deze B19 viruseiwitten benodigde genetische informatie, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 virus gerichte antilichamen.
36. Gebruik van Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de
- 20 genetische informatie, welke voor expressie van VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is, in een assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 virus gerichte antilichamen.
37. Gebruik van Spodoptera frugiperda cellen die door middel
- 25 van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de genetische informatie, welke voor expressie van VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19 benodigd is, in een immuno-fluorescentie-assay voor het in een te onderzoeken monster detecteren van tegen het B19 virus gerichte antilichamen.
- 30 38. Vaccinpreparaat voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19, omvattende recombinante virus-achtige partikels, die bestaan uit VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus
- 35 expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van deze B19 viruseiwitten benodigde genetische informatie, in

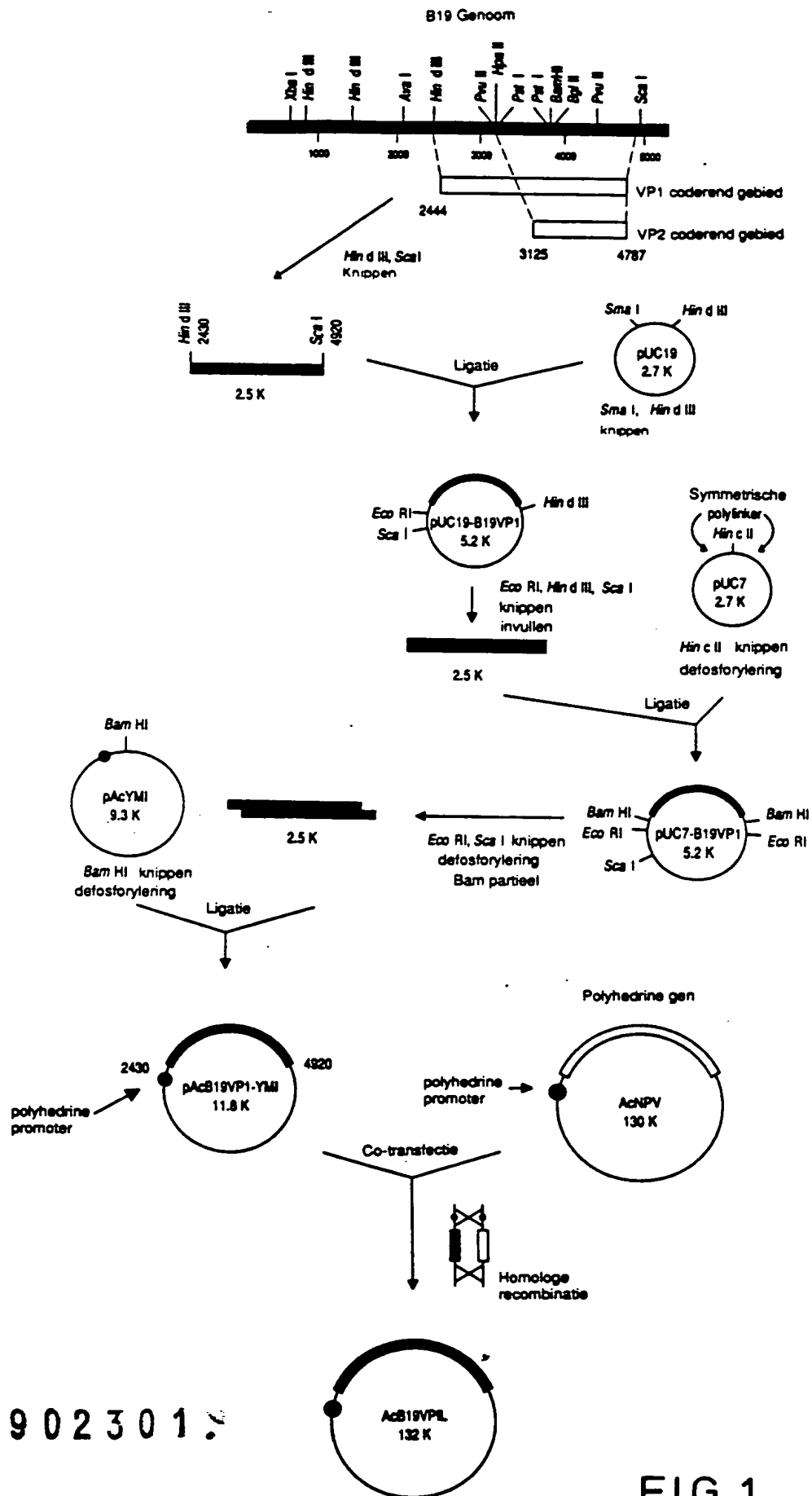
8902301.

combinatie met een of meerdere, voor vaccinatiedoeleinden geschikte dragers en/of hulpstoffen.

39. Gebruik van recombinante virus-achtige partikels, die bestaan uit VP1 en VP2 eiwit van het humane parvovirus B19, gevormd in Spodoptera frugiperda cellen die door middel van een baculovirus expressievector systeem zijn voorzien van de voor expressie van deze B19 viruseiwitten benodigde genetische informatie, voor het induceren van een immuunrespons, die bescherming verleent tegen het humane parvovirus B19.

10

8902301.



8902301.

**FIG.1**